

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Gebrauchsmusterschrift**
⑩ **DE 299 09 210 U 1**

⑤ Int. Cl.⁶:
A 61 K 31/425
A 61 K 31/40

⑦ Aktenzeichen: 299 09 210.0
⑦ Anmeldetag: 28. 5. 99
⑦ Eintragungstag: 9. 9. 99
④ Bekanntmachung
im Patentblatt: 14. 10. 99

DE 299 09 210 U 1

⑥ Innere Priorität:
198 23 831. 2 28. 05. 98

⑦ Inhaber:
Probiobrug Gesellschaft für Arzneimittelforschung
mbH, 06120 Halle, DE

⑦ Vertreter:
Boeters & Bauer, 81541 München

⑤ Neue Effektoren von Dipeptidylpeptidase IV
⑤ Isoleucyl-Thiazolidid, Isoleucyl-Pyrrolidid und deren
Salze.

DE 299 09 210 U 1

04.08.1978

NEUE EFFEKTOREN VON DIPEPTIDYLPEPTIDASE IV

Die vorliegende Erfindung betrifft Isoleucyl-Thiazolidid und Isoleucyl-Pyrrolidid, deren Salze und pharmazeutische Zusammensetzungen, die mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung oder deren Salz gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren pharmazeutisch akzeptablen Trägern und/oder Lösungsmitteln enthalten. Die Pharmazeutischen Zusammensetzungen sind zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern geeignet.

Die Erfindung betrifft also einfache Verbindungen und pharmazeutische Zusammensetzungen zur Senkung der Blutzuckerkonzentration von Säugern. Die erfindungsgemäßen Verbindungen wirken als aktivitätsmindernde Effektoren (Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren, Bindungsproteine, Antikörper u. a.) für Enzyme mit vergleichbarer oder identischer Aktivität zur enzymatischen Aktivität des Enzyms Dipeptidyl Peptidase IV.

DP IV- bzw. DP IV-analoge Aktivität (z. B. besitzt die cytosolische DP II eine der DP IV nahezu identische Substratspezifität) kommt im Blutkreislauf vor, wo sie hochspezifisch Dipeptide vom N-Terminus biologisch aktiver Peptide abspaltet, wenn Prolin oder Alanin die benachbarten Reste der N-terminalen Aminosäure in deren Sequenz darstellen.

Die Glukose-abhängigen insulinotropen Polypeptide: Gastric Inhibitory Polypeptide 1-2 (GIP_{1,2}) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP-1_{7,36}), also Hormone, die die Glukose-indu-

zierte Insulinsekretion des Pankreas stimulieren (auch Incretine genannt), sind Substrate der DP IV, da diese von den N-terminalen Sequenzen dieser Peptide die Dipeptide Tyrosinyl-Alanin bzw. Histidyl-Alanin *in vitro* und *in vivo* abspalten kann.

Die Reduktion derartiger DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität zur Spaltung solcher Substrate *in vivo* kann dazu dienen, unerwünschte Enzymaktivität unter Laborbedingungen wie auch bei pathologischen Zuständen von Säuger-Organismen wirksam zu unterdrücken. Z.B. basiert *Diabetes mellitus* Typ II (auch Altersdiabetes) auf einer verminderten Insulinsekretion bzw. Störungen in der Rezeptorfunktion, die u.a. in proteolytisch bedingten Konzentrationsanomalien der Incretine begründet sind.

Hyperglykämie und damit verbundene Ursachen bzw. Folgeerscheinungen (auch *Diabetes mellitus*) werden nach gegenwärtigem Stand der Technik durch die Verabreichung von Insulin (z.B. von aus Rinderpankreas isoliertem oder auch gentechnisch gewonnenem Material) an erkrankte Organismen in verschiedenen Darreichungsformen behandelt. Alle bisher bekannten, wie auch modernere Verfahren, zeichnen sich durch hohen Materialaufwand, hohe Kosten und oft durch entscheidende Beeinträchtigungen der Lebensqualität der Patienten aus. Die klassische Methode (tägliche *i.v.* Insulin-Injektion, üblich seit den dreißiger Jahren) behandelt die akuten Krankheitssymptome, führt aber nach längerer Anwendung u. a. zu schweren Gefäßveränderungen (Arteriosklerose) und Nervenschädigungen.

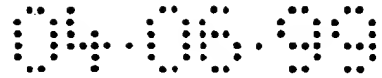
Neuerdings wird die Installation subkutaner Depot-Implantate (die Insulinabgabe erfolgt dosiert, und die täglichen Injek-

tionen entfallen) sowie die Implantation (Transplantation) intakter Langerhansscher Zellen in die funktionsgestörte Pankreasdrüse oder andere Organe und Gewebe vorgeschlagen. Derartige Transplantationen sind technisch aufwendig. Weiterhin stellen sie einen risikobehafteten chirurgischen Eingriff in den Empfängerorganismus dar und verlangen auch bei Zellverpflanzungen nach Methoden zur Suppression bzw. der Umgehung des Immunsystems.

Die Verwendung von Alanyl-Pyrrolidid und Isoleucyl-Thiazolidid als Inhibitoren von DP IV bzw. von zu DP IV analoger Enzymaktivität ist bereits aus der PCT/DE 97/00820 und die Verwendung von Isoleucyl-Pyrrolidid bzw. seinem Hydrochlorid und Isoleucyl-Thiazolidid-Hydrochlorid ist bereits aus der DD 296 075 bekannt. Bei dem in diesem Stand der Technik eingesetzten Isoleucyl-Thiazolidid bzw. Isoleucyl-Pyrrolidid handelt es sich um die natürliche Aminosäure, also L-threo-Isoleucyl-Thiazolidid bzw. L-threo-Isoleucyl-Pyrrolidid.

Es ist festgestellt worden, daß diese Verbindungen, insbesondere L-threo-Isoleucyl-Thiazolidid, gute Effektoren für DP IV und DP IV analoge Enzymaktivitäten sind. Bei der Verwendung dieser Verbindung können bei einigen Patienten bzw. Krankheitsformen jedoch gewisse Probleme auftreten:

Je nach Symptomen und Schwere z.B. von Diabetes mellitus, wäre es z.B. wünschenswert, Effektoren zur Verfügung zu haben, die eine andere Wirkung als die bekannten Verbindungen aufweisen: So ist bekannt, daß Diabetes-mellitus-Patienten individuell "eingestellt" werden müssen, um eine optimale Behandlung ihrer Krankheit zu ermöglichen. So sollte bei einigen Fällen z.B. eine verringerte Aktivität von DP IV Effektoren ausreichen.



Andererseits könnte eine zu hohe Aktivität und die permanente Verabreichung desselben Medikaments insbesondere wegen der lebenslangen Dauer der Behandlung unerwünschte Nebenwirkungen zur Folge haben. Weiter könnte es auch wünschenswert sein, gewisse Transporteigenschaften zur Erhöhung der Resorptionsgeschwindigkeit der Effektoren in vivo zu verbessern.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, neue (insbesondere aktivitätsmindernde) Effektoren zur Behandlung von z.B. beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern und ein einfaches Verfahren zur Behandlung dieser Krankheiten bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Bereitstellung von Isoleucyl-Thiazolidid und Isoleucyl-Pyrrolidid und deren Salzen gelöst.

Bei der - vorzugsweise oralen - Verabreichung dieser Effektoren an einen Säugerorganismus werden die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide GIP_{1-42} und GLP-1_{7-36} (o.a. GLP-1_{7-37} , oder deren Analoga) durch DP IV- oder DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert. Der Erfindung liegt also der Befund zugrunde, daß eine Reduktion der im Blutkreislauf agierenden DP IV- oder DP IV-ähnlichen enzymatischen Aktivität zur Beeinflussung des Blutzuckerspiegels führt. Es wurde gefunden, daß

1. die Verminderung von DP IV- bzw. DP IV-analoger Aktivität zu relativer Stabilitätserhöhung der Glukose-stimulier-

- ten, oder extern zugeführten Incretine (oder deren Analoga) führt, d.h. durch Applikation von Effektoren der DP IV bzw. DP IV-analoger Proteine der Incretin-Abbau im Blut kontrolliert werden kann;

2. die erhöhte biologische Abbaustabilität der Incretine (oder ihrer Analoga) eine Wirkungsveränderung endogenen Insulins zur Folge hat;

3. die durch Reduktion der DP IV- bzw. DP IV-analogen enzymatischen Aktivität im Blut erzielte Stabilitätserhöhung der Incretine in einer nachfolgenden Veränderung der Glukose-induzierten Insulinwirkung resultiert und damit zu einer mittels DP IV-Effektoren kontrollierbaren Modulierung des Blut-Glukosespiegels führt.

Insbesondere sind dazu erfindungsgemäß L-allo-Isoleucyl-Thiazolidid, L-threo-Isoleucyl-Thiazolidid, L-allo-Isoleucyl-Pyrrolidid und L-threo-Isoleucyl-Pyrrolidid und deren Salze geeignet.

Die möglichst orale Applikation der erfindungsgemäßen hochaffinen, niedermolekularen Enzyminhibitoren ist eine kostengünstigere Alternative z.B. zu invasiven chirurgischen Techniken bei der Behandlung pathologischer Erscheinungen. Durch chemisches Design von Stabilitäts-, Transport- und Clearance-Eigenschaften kann deren Wirkungsweise modifiziert und auf individuelle Eigenschaften abgestimmt werden.

Wie vorstehend erwähnt, kann es z.B. bei der Dauerbehandlung von Diabetes mellitus erforderlich sein, Effektoren mit einer definierten Aktivität zur Verfügung zu stellen, mit denen in-

dividuelle Bedürfnisse von Patienten erfüllt bzw. Symptome behandelt werden können. Die erfindungsgemäßen Dipeptidanaloga (im weiteren Dipeptidverbindungen genannt) weisen daher bei einer Konzentration (der Dipeptidverbindungen) von 10 μM , insbesondere bei den in Tabelle 1 angegebenen Bedingungen, eine Aktivitätsminderung von Dipeptidylpeptidase IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivitäten von mindestens 80% auf. Weiterhin sind die Transporteigenschaften, besonders der L-allo-Verbindungen, insbesondere durch den Peptidtransporter Pep T1, deutlich verbessert.

Die Salze der erfindungsgemäßen Dipeptidverbindungen können z.B. organische Salze wie Acetate, Succinate, Tartrate oder Fumarate oder anorganische Säurereste wie Phosphate oder Sulfate sein. Besonders bevorzugt werden die Salze, die eine hervorragende Wirkung bei einer hohen Stabilität gegenüber Hydrolyse aufweisen und wesentlich weniger löslich sind als die Hydrochloride. Diese Eigenschaften sind auch bei der Galenik von Vorteil.

Besonders bevorzugte werden Verbindungen, bei denen das molare Verhältnis von Isoleucyl-Thiazolididkomponente bzw. Isoleucyl-Pyrrolididkomponente zu Salzkomponente 1 : 1 oder 2 : 1 beträgt.

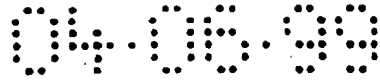
Die Erfindung betrifft somit Effektoren der Dipeptidyl Peptidase IV (DP IV)- bzw. DP IV-analoger Enzymaktivität, die insbesondere zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykaemie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säuger-Organismus eingesetzt werden können.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung pharmazeutische Zusammensetzungen, also Medikamente, die mindestens eine erfindungsgemäße Verbindung oder deren Salz gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren pharmazeutisch akzeptablen Trägern und/oder Lösungsmitteln enthalten.

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können z.B. als parenterale oder enterale Formulierungen vorliegen und entsprechende Träger enthalten bzw. sie können als orale Formulierungen vorliegen, die entsprechende zur oralen Verabreichung geeignete Träger enthalten können. Vorzugsweise liegen sie als orale Formulierungen vor.

Zusätzlich können die pharmazeutischen Zusammensetzungen einen oder mehrere hypoglykämisch wirkende Wirkstoffe enthalten, die an sich bekannte Wirkstoffe sein können.

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen, die die erfindungsgemäßen Effektoren der DP IV- bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität enthalten, verhindern oder mildern die pathologischen Stoffwechsel-Anomalien von Säuger-Organismen wie z.B. beeinträchtigte Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern. Die erfindungsgemäßen Effektoren der DP IV bzw. der DP IV-analogen Enzymaktivität können also zur Senkung des Blutzucker-Spiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukose-Konzentration im Serum eines Säuger-Organismus verwendet werden.



Die erfindungsgemäß applizierten Effektoren der DP IV- bzw. DP IV-analoger Enzyme können in pharmazeutisch anwendbaren Formulierungen oder Formulierungskomplexen als Inhibitoren, Substrate, Pseudosubstrate, Inhibitoren der DP IV-Expression, Bindungsproteine oder Antikörper dieser Enzymproteine oder Kombinationen aus diesen verschiedenen Stoffen, die DP IV- bzw. DP IV-analoge Proteinkonzentration im Säugerorganismus reduzieren, zum Einsatz kommen. Die erfindungsgemäßen Effektoren ermöglichen eine individuell einstellbare Behandlung von Patienten bzw. Krankheiten, wobei insbesondere individuell auftretende Unverträglichkeiten, Allergien und Nebenwirkungen vermieden werden können.

Auch weisen die Verbindungen unterschiedliche zeitliche Verläufe der Wirksamkeit auf. Dadurch wird dem behandelnden Arzt die Möglichkeit in die Hand gegeben, differenziert auf die individuelle Situation eines Patienten zu reagieren: Einerseits kann er die Geschwindigkeit des Eintritts der Wirkung und andererseits die Dauer der Wirkung und insbesondere die Stärke der Wirkung genau einstellen.

Die erfindungsgemäßen Effektoren und pharmazeutischen Zusammensetzungen stellen eine neuartige Herangehensweise zur Senkung erhöhter Blutglukosekonzentration im Serum von Säugern dar. Sie sind einfach, kommerziell nutzbar und zur Anwendung bei der Therapie, insbesondere von Erkrankungen, die auf überdurchschnittlichen Blutglukosewerten basieren, bei Säugern und insbesondere in der Humanmedizin geeignet.

Die Effektoren werden z.B. in Form von pharmazeutischen Präparaten verabreicht, die den Wirkstoff in Kombination mit üblichen aus dem Stand der Technik bekannten Trägermaterialien

enthalten. Beispielsweise werden sie parenteral (z.B. i.v., in physiologischer Kochsalzlösung) oder enteral (z.B. oral, formuliert mit üblichen Trägermaterialien wie z. B. Glukose) appliziert.

In Abhängigkeit von ihrer endogenen Stabilität und ihrer Bioverfügbarkeit müssen pro Tag einfache oder auch mehrfache Gaben der Effektoren erfolgen, um die erwünschte Normalisierung der Blutglukosewerte zu erreichen. Z.B. kann ein solcher Dosisbereich beim Menschen im Bereich von 0.01 mg bis 30.0 mg pro Tag, vorzugsweise im Bereich von 0.01 bis 10 mg Effektorsubstanz pro Kilogramm Körpergewicht liegen.

Es wurde gefunden, daß durch Verabreichung von Effektoren der Dipeptidyl Peptidase IV bzw. DP IV-analoger Enzymaktivitäten im Blut eines Säugers, durch deren damit verbundene, temporäre Aktivitätsreduktion, in kausaler Folge die endogenen (oder zusätzlich exogen verabreichten) insulinotropen Peptide Gastric Inhibitory Polypeptide 1-42 (GIP_{1-42}) und Glucagon-Like Peptide Amide-1 7-36 (GLP-1_{7-36}) (o.a. GLP-1_{7-37} , oder deren Analoga) durch DP IV- und DP IV-ähnliche Enzyme vermindert abgebaut werden und damit die Konzentrationsabnahme dieser Peptidhormone bzw. ihrer Analoga verringert bzw. verzögert werden. Die durch die Wirkung von DP IV-Effektoren erzielte, erhöhte Stabilität der (endogen vorhandenen oder exogen zugeführten) Incretine oder ihrer Analoga, die damit vermehrt für die insulinotrope Stimulierung der Incretin-Rezeptoren der Langerhansschen Zellen im Pankreas zur Verfügung stehen, verändert u.a. die Wirksamkeit von körpereigenem Insulin, was eine Stimulierung des Kohlehydratstoffwechsels des behandelten Organismus nach sich zieht.

Als Resultat sinkt der Blutzuckerspiegel unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum des behandelten Organismus. Damit können Stoffwechselanomalien wie Glukosurie, Hyperlipidämie sowie mögliche schwere metabolische Azidosen und Diabetes mellitus, Krankheitsbilder die Folge einer über einen längeren Zeitraum erhöhten Glukosekonzentrationen im Blut sind, verhindert bzw. gemildert werden.

In der Reihe der aus dem Stand der Technik bekannten, oral wirksamen Antidiabetika ist bisher eine derartig wirksame, niedermolekulare Substanzklasse (mit Ausnahme des Biguanides Metformin: Molekulargewicht 130) nicht bekannt. Die Molekulargewichte der Aminoacyl Thiazolidide bewegen sich zwischen 146 (Glycyl Thiazolidid), 203 (Isoleucyl Thiazolidid) und 275 (Tryptophanoyl Thiazolidid). Im Vergleich bewegen sich die Molekulargewichte der Sulphonylharnstoffe (Glibenclamid: 494), der Saccharide (Acarbose: 630) sowie der Thiazolidindione (Pioglitazon: 586) im Bereich um 500 bis 700 Da. Physiologisch wird Isoleucyl Thiazolidid durch Prolin Aminopeptidase bzw. Prolin Dipeptidase (Prolidase) sowie durch saure Hydrolyse in körpereigene Substanzen, Isoleucin und Cysteamin, hydrolysiert, so daß die Verwendung der erfindungsgemäßen Verbindung als oral verfügbares Antidiabetikum eine Bereicherung der Pharmazie darstellt.

Bei Ratten und Mäusen ist experimentell induzierte Hyperglykämie durch orale Verabreichung mit den erfindungsgemäß verwendeten Verbindungen überdurchschnittlich gut behandelbar (Tabellen 2 und 3). Die Verabreichung des 500- bis 1000-fachen der wirksamen Dosis führte zu keiner nachweisbaren pathologischen Veränderung während drei-wöchiger toxikologischer Experimente an Ratten und Mäusen.

Die vorteilhafte Wirkung von erfindungsgemäßen Verbindungen auf DP IV ist in Tabelle 1 beispielhaft belegt:

Tabelle 1: Wirkung verschiedener Effektoren auf die durch Di-peptidyl Peptidase IV katalysierte Hydrolyse von 0,4 mM des Substrates H-Gly-Pro-pNA bei 30°C, pH 7,6 und einer Ionenstärke von 0,125.

Effektor	Effektoraffinität zu DP IV: K_i [nM]	% Restaktivität der DP IV in Gegenwart von 10 μ M Effektor
Metformin	$\gg 1.000.000$	100
Glibenclamid	$\gg 1.000.000$	100
Acarbose	$\gg 1.000.000$	100
Ile-Thiazolidid	190	10
Ile-Pyrrolidid	210	12,3

Es ist bekannt, daß Aminoacyl Pyrrolidide und Aminoacyl Thiazolidide durch die in den Mucosazellen des Dünndarms, im Serum und in Leberzellen vorhandenen Aminopeptidasen abgebaut werden können und der Thiazolidinring zur Öffnung in Gegenwart von Säuren (beispielsweise im Magen) unter Bildung des adäquaten Cysteamin-Derivates neigt [vgl. US 458407]. Es war daher überraschend, eine dosisabhängige Wirksamkeit der Wirkstoffe nach per oraler Verabreichung zu finden. Die Dosisabhängigkeit der Wirkung von L-allo-Ile-Thiazolidid auf die Serum-DP IV Aktivität nach oraler Applikation von L-allo-Isoleucyl Thiazolidid an gesunden Wistarratten ist mit folgender Tabelle belegt:

Tabelle 2: Restaktivität der DP IV im Serum gegenüber 0,4 mM des Substrates H-Gly-Pro-pNA bei 30°C, pH 7,6 und einer Ionenstärke von 0,125, nach oraler Gabe und in Abhängigkeit von der Dosis L-allo-Isoleucyl Thiazolidid, bestimmt 30 min nach Applikation des Inhibitors.

Dosis pro Versuchstier	Restaktivität der DP IV in %
0 mg	100
2,5 mg	52
5,0 mg	40
10 mg	28
20 mg	29

Ausgesprochen überraschend und wünschenswert ist die im diabetischen Tiermodell erzielte Glukose-reduzierende Wirkung des erfindungsgemäßen Wirkstoffs L-allo-Isoleucyl Thiazolidid nach seiner oralen Verabreichung bei zeitgleicher oraler Glukose-Stimulierung (Tabelle 3).

Zur Verstärkung der blutglukosesenkenden Wirkung verschiedener Antidiabetika werden häufig Kombinationen verschiedener oral wirksamer Antidiabetika eingesetzt. Da sich die antihyperglykämische Wirkung der erfindungsgemäßen Effektoren unabhängig von anderen bekannten oral applizierbaren Antidiabetika entfaltet, eignen sich die erfindungsgemäßen Wirkstoffe analog in entsprechender galenischer Form, zu Erzielung des gewünschten normoglykämischen Effektes, zum Einsatz bei Kombinationstherapien.

Somit können die erfindungsgemäßen Verbindungen und pharmazeutischen Zusammensetzungen in an sich bekannter Weise in die üblichen Formulierungen überführt werden, wie z. B. Tabletten, Kapseln, Dragees, Pillen, Suppositorien, Granulate, Aerosole, Sirupe, flüssige, feste und cremeartige Emulsionen und Suspensionen und Lösungen unter Verwendung inerter, untoxischer, pharmazeutisch geeigneter Träger- und Zusatzstoffe oder Lösungsmittel. Hierbei liegen die therapeutisch wirksamen Verbindungen jeweils vorzugsweise in einer Konzentration von etwa 0.1 bis 80, vorzugsweise von 1 bis 50 Masseprozent der Gesamtmischung vor, d.h. in Mengen, die ausreichend sind, um den angegebenen Dosierungsspielraum zu erreichen.

Tabelle 3: Reduktion der zirkulierenden Blutglukose innerhalb 60 min nach oraler Verabreichung von 20 μ M L-allo-Ile-Thiazolidid an Ratten verschiedener Tiermodelle bei zeitgleichem Glukosetoleranztest (Angaben in % bezogen auf normoglykämische Werte).

Tiermodell	Glukosekonzentration in % Kontrolle	Glukosekonzentration in % L- allo-Ile-Thiazolidid behandelt
Wistarratte, normal	100	82
Wistarratte (Diabetes 2b - Model, dick)	100	73

Die gute Resorption der erfindungsgemäßen Verbindungen durch Schleimhäute des gastrointestinalen Traktes ermöglicht die Anwendung von vielen galenischen Zubereitungen:

Die Substanzen können als Medikament in Form von Dragees, Kapseln, Beißkapseln, Tabletten, Tropfen, Sirup, aber auch als Zäpfchen oder als Nasensprays angewendet werden.

Die Formulierungen werden beispielsweise hergestellt durch Strecken des Wirkstoffs mit Lösungsmitteln und/oder Trägerstoffen, gegebenenfalls unter Verwendung von Emulgatoren und/oder Dispergiermitteln, wobei z. B. im Fall des Einsatzes von Wasser als Verdünnungsmittel gegebenenfalls organische Lösungsmittel als Hilfslösungsmittel verwendet werden können.

Als Hilfsstoffe seien beispielhaft aufgeführt: Wasser, untoxische organische Lösungsmittel, wie Paraffine (z. B. Erdölfraktionen), pflanzliche Öle (z. B. Rapsöl, Erdnußöl, Sesamöl), Alkohole (z.B. Ethylalkohol, Glycerin), Glykole (z.B. Propylenglykol, Polyethylenglykol); feste Trägerstoffe, wie z. B. natürliche Gesteinsmehle (z. B. hochdisperse Kieselsäure, Silikate), Zucker (z.B. Roh-, Milch- und Traubenzucker); Emulgiermittel, wie nichtionogene und anionische Emulgatoren (z. B. Polyoxyethylen-Fettsäure-Ester, Polyoxyethylen-Fettalkohol-Ether, Alkylsulfonate und Arylsulfonate), Dispergiermittel (z.B. Lignin, Sulfitablaugen, Methylcellulose, Stärke und Polyvinylpyrrolidon) und Gleitmittel (z.B. Magnesiumstearat, Talkum, Stearinsäure und Natriumlaurylsulfat) und gegebenenfalls Aromastoffe.

Die Formulierungen liegen wie üblich, vorzugsweise als enterale oder parenterale, insbesondere orale Formulierungen vor. Im Falle der enteralen Formulierungen können Tabletten außer den genannten Trägerstoffen weitere Zusätze wie Natriumcitrat, Calciumcarbonat und Calciumphosphat, zusammen mit verschiedenen Zuschlagstoffen, wie Stärke, vorzugsweise Kartoffelstärke,

Gelatine und dergleichen enthalten. Weiterhin können Gleitmittel, wie Magnesiumstearat, Natriumlaurylsulfat und Talkum zum Tablettieren mitverwendet werden. Im Falle wäßriger Suspensionen und/oder Elixieren, die für orale Anwendungen gedacht sind, können die Wirkstoffe außer mit den oben genannten Hilfsstoffen zusätzlich mit verschiedenen Geschmacksaufbesserern oder Farbstoffen versetzt werden.

Bei einer parenteralen Formulierung können Lösungen der Wirkstoffe unter Verwendung geeigneter flüssiger Trägermaterialien eingesetzt werden. Im allgemeinen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, bei intravenöser Applikation Mengen von etwa 0,01 bis 2,0 mg/kg, vorzugsweise etwa 0,01 bis 1,0 mg/kg Körpergewicht pro Tag zur Erreichung wirksamer Ergebnisse zu verabreichen, und bei enteraler Applikation beträgt die Dosierung etwa 0,01 bis 2,0 mg/kg, vorzugsweise 0,01 bis 1,0 mg/kg Körpergewicht pro Tag. Die entsprechenden Formulierungen sollten daher entsprechende Mengen der Effektoren enthalten.

Trotzdem kann es gegebenenfalls erforderlich sein, von den genannten Mengen abzuweichen, und zwar in Abhängigkeit vom Körpergewicht des Versuchstieres oder Patienten bzw. der Art des Applikationsweges, aber auch aufgrund der Tierart und deren individuellem Verhalten gegenüber dem Medikament bzw. Intervall, zu welchem die Verabreichung erfolgt. So kann es in einigen Fällen ausreichend sein, mit weniger als der vorgenannten Mindestmenge auszukommen, während in anderen Fällen die genannte obere Grenze überschritten werden muß. Im Fall der Applikation größer Mengen kann es empfehlenswert sein, diese in mehrere Einzelgaben über den Tag zu verteilen. Für die Applikation in der Humanmedizin ist der gleiche Dosierungsspiel-

04.08.99

raum vorgesehen. Sinngemäß gelten hierbei auch die obigen Ausführungen.

Beispiele für pharmazeutische Formulierungen

1. Kapseln mit 100 mg L-threo-Isoleucyl Thiazolidid (1:1)
pro Kapsel:

Für ca. 10 000 Kapseln wird eine Lösung folgender Zusammensetzung hergestellt:

L-threo-Isoleucyl Thiazolidid	1,0 kg
Glycerin	0,5 kg
Polyethylenglykol	3,0 kg
Wasser	<u>0,5 kg</u>
	5,0 kg

Die Lösung wird nach an sich bekannter Weise in Weichgelatine-kapseln abgefüllt Die Kapseln sind zum Zerbeißen oder zum Schlucken geeignet

2. Tabletten bzw. lackierte Tabletten oder Dragees mit 100 mg L-allo-Isoleucyl Thiazolidid (1:1):

Die folgenden Mengen beziehen sich auf Herstellung von 100 000 Tabletten:

L-allo-Isoleucyl Thiazolidid, fein vermahlen	10,0 kg
Glukose	4,35 kg
Milchzucker	4,35 kg

04.05.99

17

Stärke	4,50 kg
Zellulose, fein vermahlen	4,50 kg

Obige Bestandteile werden gemischt und anschließend mit einer Lösung, hergestellt aus

Polyvinylpyrrolidon	2,0 kg
Polysorbat	0,1 kg
und Wasser	ca. 5,0 kg

versehen und in an sich bekannter Weise granuliert, indem die feuchte Masse geraspelt und nach Zugabe von 0,2 kg Magnesiumstearat getrocknet wird. Die fertige Tablettenmischung von 30,0 kg wird zu gewölbten Tabletten von 300 mg Gewicht verarbeitet. Die Tabletten können nach an sich bekannter Weise lackiert oder dragiert werden.

Die technischen Daten bevorzugter Verbindungen werden nachstehend angegeben.

Untersuchungen zu Ile-Thia*Fumarat (Isomere)

Substanz	K_i	Fp (°C)	CE (min)	MS	$[\alpha]_{H_2O}$
L-threo-IT*F	$8 \cdot 10^{-8}$	150 ^{usc}	160	203	-10,7 (405nm)
L-allo-IT*F	$2 \cdot 10^{-7}$	145-6	154	203	-4,58 (380nm)

IT*F = Isoleucyl-Thiazolidid Fumarat

Die NMR und HPLC Daten bestätigen, daß es sich um die entsprechenden Substanzen handelte

Meßbedingungen für die K_i -Bestimmung der Substanzen

Enzym: DPIV_{Schweineniere}, 0,75mg/ml, 18U/ml (GPpNA)
in 25mM Tris pH 7,6, 30% Ammoniumsulfat, 0,5mM EDTA,
0,5mM DTE
Stammlösung: 1:250 verdünnt in Meßpuffer

Puffer: 40mM HEPES pH 7,6, I=0,125 (KCl)

Substrat: GPpNA*HCl
Stammlösung: 2,1mM

Meßgerät: Perkin-Elmer Bio Assay Reader, HTS 7000 Plus,
T=30°C
 λ = 405nm

Meßansatz: 100µl Puffer
100µl Substrat (3 verschiedene Konzentrationen 0,8mM
- 0,2mM)
50µl Wasser/Inhibitor (7 verschiedene Konzentrationen
2,1µM - 32,8nM)
10µl Enzym

Puffer, Wasser/Inhibitor und Enzym wurden auf 30°C vortemperi-
ert und die Reaktion durch die Zugabe von ebenfalls vortem-
periertem Substrat gestartet. Es wurden 4fach Bestimmungen
durchgeführt. Die Meßzeit betrug 10min.

Schmelzpunktbestimmung

Schmelzpunkte wurden an einem Kofler-Heiztischmikroskop der
Leica-Aktiengesellschaft, die Werte sind nicht korrigiert,
oder an einem DSC-Gerät (bei Heumann-Pharma) bestimmt.

Optische Rotation

Die Drehwerte wurden bei unterschiedlichen Wellenlängen an einem „Polarimeter 341“ oder höher der Fa. Perkin Elmer aufgenommen.

Meßbedingungen für die Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden an einem „API 165“ bzw. „API 365“ der Fa. PE Sciex mittels Elektrosprayionisation (ESI) aufgenommen. Es wird mit einer ungefähren Konzentration von $c = 10 \mu\text{g/ml}$ gearbeitet, die Substanz wird in MeOH / H₂O 50:50, 0,1 % HCO₂H aufgenommen, die Infusion erfolgt mit Spritzenpumpe (20 $\mu\text{l/min}$). Die Messungen erfolgten im Positivmodus $[M+H]^+$, die ESI-Spannung beträgt $U = 5600\text{V}$.

Die Salze weisen die folgenden Daten auf:

IT*Salz	K_1	M (gmol^{-1})	Fp ($^{\circ}\text{C}$)
Fumarat	8,3 e-8	520,71	156

Löslichkeitsuntersuchung der Fumarate des Ile-Thia

Ile-Thia*Fum

Einwaage 10,55 mg

entspricht 0,02 mmol (520,72 g/mol)

Zugabe von 100 μl H₂O_{dest}

100 μl keine Lösung, optisch: keine Oberflächenbenetzung

ab 200 μl sukzessiver Beginn der Löslichkeit

bei 400 μl ist eine vollständiges Lösen zu beobachten

2,63 %

Bei diesem Salz wurde also festgestellt, daß es kaum benetzbar ist und sich nicht zersetzt.

Allgemeine Synthese Ile-Thia*Salz

Die Boc-geschützte Aminosäure Boc-Ile-OH wird in Essigsäure-ethylester vorgelegt, der Ansatz wird auf ca. -5°C gekühlt. N-Methylmorpholin wird zugetropft, Pivalinsäurechlorid (Labor) bzw. Neohexanoylchlorid (Technikum) wird unter Temperaturkonstanz zugetropft.

Die Reaktion wird für wenige Minuten zur Aktivierung gerührt. N-Methylmorpholin (Labor) und Thiazolidinhydrochlorid (Labor) werde nacheinander zugetropft, Thiazolidin (Technikum) wird zugegeben. Die Aufarbeitung im Labor erfolgt klassisch mit Salzlösungen, im Technikum wird der Ansatz mit NaOH- und CH_3COOH -Lösungen gereinigt.

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wird durch HCl / Dioxan (Labor) bzw. H_2SO_4 (Technikum) erzielt.

Im Labor wird das Hydrochlorid aus EtOH / Ether kristallisiert.

Im Technikum wird das freie Amin durch Zugabe von NaOH / NH_3 dargestellt. Fumarsäure wird in heißem Ethanol gelöst, das freie Amin wird zugetropft, es fällt (Ile-Thia)₂-Fumarat ($M = 520,71 \text{ g mol}^{-1}$).

Allgemeine Synthese Ile-Pyr*Salz

Die Boc-geschützte Aminosäure Boc-Ile-OH wird in Essigsäure-ethylester vorgelegt, der Ansatz wird auf ca. -5°C gekühlt. N-Methylmorpholin wird zugetropft, Pivalinsäurechlorid wird unter Temperaturkonstanz zugetropft.

Die Reaktion wird für wenige Minuten zur Aktivierung gerührt. N-Methylmorpholin und Pyrrolidin werde nacheinander zugetropft. Die Aufarbeitung im Labor erfolgt klassisch mit Salzlösungen, im Technikum wird der Ansatz mit NaOH- und CH_3COOH -Lösungen gereinigt.

Die Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wird durch HCl / Dioxan oder HCl / Chloroform bzw. H_2SO_4 (Technikum) erzielt.

Im Labor wird das Hydrochlorid aus EtOH / Ether kristallisiert.

Im Technikum wird das freie Amin durch Zugabe von NaOH / NH_3 dargestellt. Fumarsäure wird in heißem Ethanol gelöst, das freie Amin wird zugetropft, es fällt (Ile-Pyrr)₂-Fumarat ($M = 484,3 \text{ g mol}^{-1}$).

Ausgewählte Beispiele mit kinetischen und dazu gehörigen Synthesedaten:

Tabelle 1: Wirkung verschiedener Effektoren auf die Dipeptidyl Peptidase IV katalysierte Hydrolyse von 0,4 mM des Substrates H-Gly-Pro-pNA bei 30°C, pH 7,6 und einer Ionenstärke von 0,125

Substanz	Effektoraffinität zu DP IV : K _i (nM)	% Restaktivität der DP IV in Gegenwart von 10 µM Effektor
L-threo-Ile-Thia	130	7,8
L-allo-Ile-Thia	190	10
L-threo-Ile-Pyr	210	12,3

Tabelle 2: Synthesedaten

Verbindung	Summenformel M _r Ausbeute	MS [M+H] ⁺ DC/R _f /System* F _p	[α] _D ²⁰ Kon- zentration LM	HPLC R _f [min]/ Gradient
H-Ile-Thia*HCl	C ₉ H ₁₆ N ₂ OSCl 238,77 92 %	203 0,79/C 82-84 ° C	-3,1, c = 1 Methanol	12,17
H-Ile-Pyrr*HCl	C ₁₀ H ₂₁ N ₂ OCl 220,74 94 %	185 0,76/C 173-175 ° C	+7,2, c = 1 Methanol	12,10

* System: Essigester (450 ml): Pyridin (72,5 ml): Essigsäure (22,5 ml): H₂O (41,5 ml)

04.08.99

CE-Trennung der Isomere/Enantiomere des Isoleucyl Thiazolidids

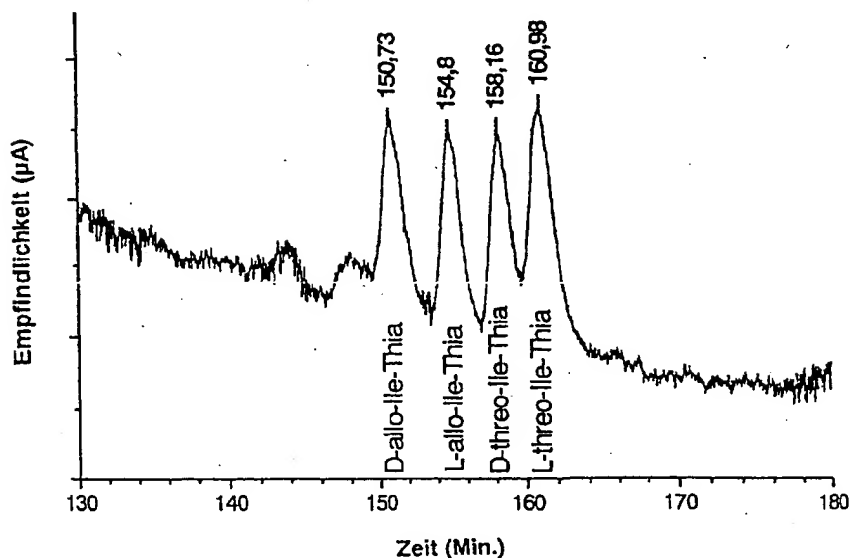


Abb. 1: CE-Trennung von einer 1:1:1:1 - Mischung von L-threo-Ile-Thia*Fum, L-allo-Ile-Thia*Fum, D-threo-Ile-Thia*Fum, D-allo-Ile-Thia*Fum

Methode und Meßbedingungen:

CE-Untersuchungen erfolgten am „P/ACE™ System MDQ“ der Firma Beckman:

Substanz	CE (min)
L-threo-IT*F	160
D-threo-IT*F	158
L-allo-IT*F	154
D-allo-IT*F	150

Laufbedingungen:

Puffer: 20 mM Phosphat, pH 7,0, 100 mM β -Hydroxy-propyl-cyclodextrin
Kapillare: 50 / 60,2 cm, 25 μ m Innendurchmesser, beschichtet mit Acrylamid
Spannung: 10 kV
Detektion: Photo-Dioden-Array-Detektor bei 214 nm
Temperatur: 7°C

CE-Trennung von Ile-Thia*Fumarat

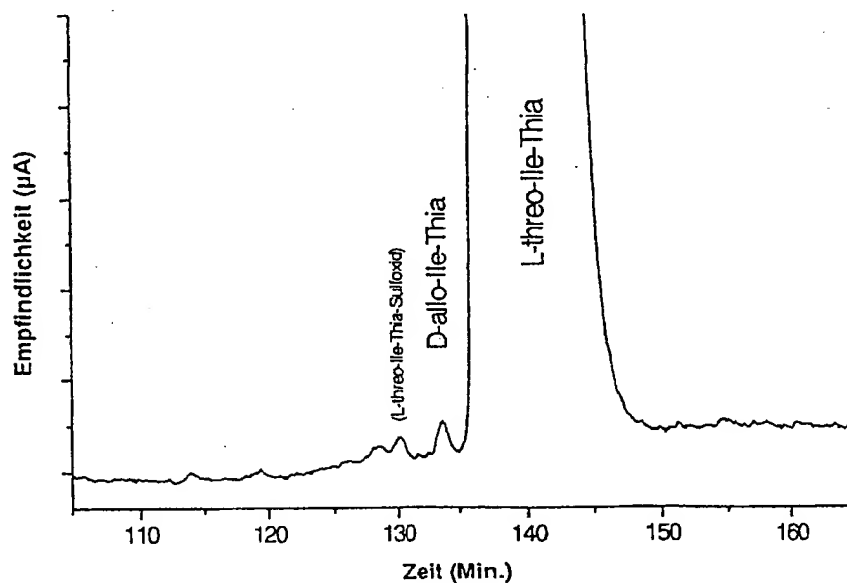


Abb. 2: CE-Trennung von einer 1:1000 Mischung L-threo-Ile-Thia*Fumarat zu D-allo-Ile-Thia*Fumarat

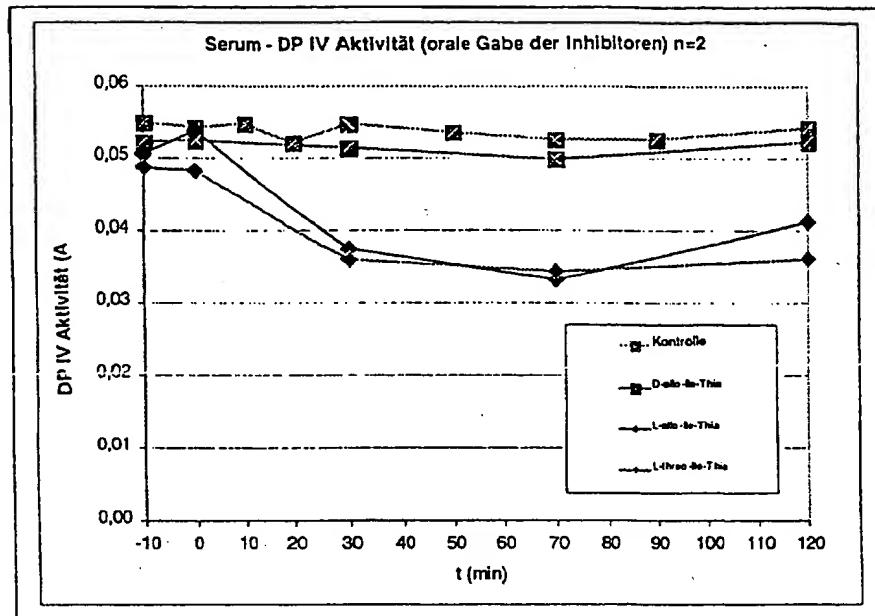
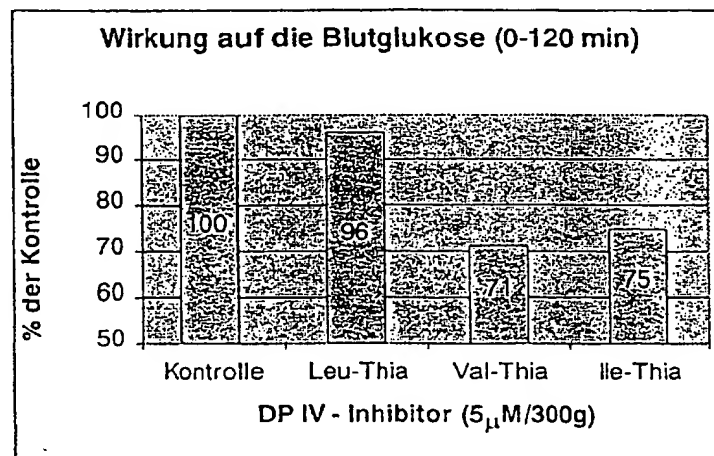


Abb. 3: Serum DP IV-Aktivität nach oraler Applikation verschiedener H-Ile-Thia Stereoisomere ($5 \mu\text{M}/300 \text{ g}$ Ratte). Beeinflussung der Enzymaktivität erfolgt nur durch L-allo-Ile-Thia und L-threo-Ile-Thia.

Abb. 4: Wirkung verschiedener Aminoacyl-Thiazolidide auf die Glukosetoleranz der Ratte (Oraler Glukosetoleranztest mit $2 \text{ g}/300 \text{ g}$ Wistar ratte zum Zeitpunkt 0, Gabe der DP IV-Inhibitoren 10 min vor oraler Glukosestimulierung)



04.05.99

Schutzansprüche

1. Isoleucyl-Thiazolidid, Isoleucyl-Pyrrolidid und deren Salze.
2. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um L-allo-Isoleucyl-Thiazolidid, L-threo-Isoleucyl-Thiazolidid, L-allo-Isoleucyl-Pyrrolidid, L-threo-Isoleucyl-Pyrrolidid und deren Salze handelt.
3. Verbindung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Salze organische Salze wie Acetate, Succinate, Tartrate oder Fumarate oder anorganische Säurereste wie Phosphate oder Sulfate sind.
4. Verbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß das molare Verhältnis von Isoleucyl-Thiazolididkomponente oder Isoleucyl-Pyrrolididkomponente zur Salzkomponente 1 : 1 oder 2 : 1 beträgt.
5. Pharmazeutische Zusammensetzung, die mindestens eine Verbindung nach einem der vorstehenden Ansprüche gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren pharmazeutisch akzeptablen Trägern und/oder Lösungsmitteln enthält.
6. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um einen Träger für parenterale oder enterale Formulierungen handelt.

7. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß sie in einer Formulierung zur oralen Verabreichung vorliegt.
8. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 5 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß sie zusätzlich einen hypoglykämisch wirkenden Wirkstoff enthält.
9. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 5 bis 8 zur Aktivitätsminderung von Dipeptidylpeptidase IV bzw. von Dipeptidylpeptidase IV analogen Enzymaktivitäten.
10. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 5 bis 8 zur Senkung des Blutzuckerspiegels unter die für Hyperglykämie charakteristische Glukosekonzentration im Serum eines Säugers.
11. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 5 bis 8 zur oralen Behandlung von mit Diabetes mellitus im Zusammenhang stehenden Stoffwechselerkrankungen.
12. Pharmazeutische Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 5 bis 8 zur Behandlung von beeinträchtigter Glukosetoleranz, Glukosurie, Hyperlipidämie, metabolischen Azidosen, Diabetes mellitus, diabetischer Neuropathie und Nephropathie sowie von durch Diabetes mellitus verursachten Folgeerkrankungen von Säugern.